

子の発現及びエピゲノム修飾について解析を行う。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1)倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2)意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3)個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4)希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5)研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

3. 研究結果及び考察

1) 難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

当院での倫理審査委員会での承認を得た後、患者同意のもと血液からゲノムを採取した。

昨年度および本年度を合計して潰瘍性大腸炎患者23名、クローン病患者51名の計74名の検体を採取した。平均年齢は36.2才、女性31名、男性43名であった。クローン病51症例のうち43症例が有効例であった。無効例は8例でそのうち一次無効は2症例であった。潰瘍性大腸炎では23例中16例が有効例であり、無効例は7症例であった。

2) 難治性炎症性腸疾患のエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

当院での倫理審査委員会に承認され、患者をリクルート中である。

4. 評価

1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。ゲノム採取については多くの検体を採取し解析可能であるエピゲノム解析についても倫理委員会にて承認されたため今後患者解析が可能となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究結果に関しては抗TNF α 抗体製剤を使用した多数の患者検体を解析予定であり、治療抵抗性に関する原因を解明することで、治療効果予測モデルの構築および新規治療薬の開発に寄与出来ると考える。さらに抗TNF α 抗体製剤は世界中の炎症性腸疾患患者に対して使用されているため治療効果予測モデル構築は国際的にみてもインパクトがあると考えられる。

2) 今後の展望について

来年度も患者検体の収集を行い、治療抵抗性に関する因子の探索を行う。

3) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられた。

5. 結論

当初の予定どおり検体の収集および臨床情報の集約を行った。今後網羅的なゲノム、エピゲノム解析により治療抵抗性因子の同定を試みるための基盤を構築した。

6. 研究発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 432(1):175-181, 2013.
- 2) Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M: Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 19:418-422, 2013.
- 3) Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, on behalf of the guideline project group of intractable Inflammatory Bowel Disease granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese: Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol.* 48(1):31-72, 2013
- 4) Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M: Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Digestive Endoscopy.* 24(6):470-474, 2012
- 5) Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Morio-Akiyama J, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M: Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy for the diagnosis of inverted Meckel's diverticulum: a case report. *Journal of Medical Case Reports.* 6(1):328, 2012
- 6) Fujita K, Naganuma M, Saito E, Suzuki S, Araki A, Negi M, Kawachi H, Watanabe M: Histologically confirmed IgG4-related small intestinal lesions diagnosed via double balloon enteroscopy. *Dig Dis Sci.* 57(12):3303-3308, 2012
- 7) Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: Retrieval of serum

- infliximab level by shortening the maintenance infusion interval is correlated with clinical efficacy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 18: 1480-1487, 2012
- 8) Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Watanabe M, Hibi T, Takebayashi T: Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients. *J Gastroenterol.* 47:961-968, 2012.
 - 9) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 419:238-243, 2012.
 - 10) Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, Watanabe M: Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients. *Journal of Crohn's & colitis.* 7(4):308-313, 2012
 - 11) Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Takeuchi Y, Watanabe M: A prospective analysis of the incidence and risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print) 2012
 - 12) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4+ memory T cells. *Gut.* (Epub ahead of print) 2012
 - 13) Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi M, Watanabe M: Histological diagnosis of follicular lymphoma by biopsy of small intestinal normal mucosa. *Digestive Endoscopy.* 39(7):533-539, 2012
 - 14) Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T: T-helper 17 and interleukin-17-producing lymphoid tissue inducer-like cells make different contributions to colitis in mice. *Gastroenterology.* 143(5):1288-1297, 2012
 - 15) Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with crohn's disease. *Intern Med.* 52: 125-128, 2012
 - 16) Watanabe M, Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y: Comparison of QD and T1D oral mesalazine for maintainance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study (in press) *Inflammatory Bowel Dis.* 2012
 - 17) Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam SS, Camez A: Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 6:160-173, 2012.
 - 18) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for a third operation for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 18: 17-24, 2012
 - 19) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Time trend and risk factors for reoperation in Crohn's disease in Japan. *Hepatogastroenterology.* 59: 1081-1086, 2012
 - 20) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18:618-623, 2012.
 - 21) Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M: The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 188(6):2524-2536, 2012

学会発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: The acquirement of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月20日
- 2) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colitic cancer induces cancer stemness and chemoresistance. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月19日
- 3) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: New classification based on Atoh1 expression in colon cancer might be useful as Biomarker. 第10回日本臨床腫瘍学会. Osaka, 2012年7月27日
- 4) Watanabe M: Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Diseases. International Ulcer Week 2012. Tokyo, 2012年7月12日
- 5) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. ISSCR2012. Yokohama, 2012年6月14日
- 6) Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Fukuda M, Nozaki K, Yamauchi Y, Mochizuki W, Zheng X, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M:

- Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
- 7) Tsuchiya K, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Nakamura T, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colon cancer acquires cancer stemness and chemoresistance. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
 - 8) Watanabe M: Stem Cells. DDW. San Diego, 2012年5月22日
 - 9) Nemoto Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Matsumoto S, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop Th1/Th17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. AGA. San Diego, 2012年5月22日
 - 10) Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin response via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells is regulated by Notch signaling. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
 - 11) Nemoto Y, Kanai T, Matsumoto T, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop Th1/Th17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
 - 12) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of p-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelial cells three-dimensionally cultured in vitro. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
 - 13) Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Gelsolin superfamily genes, Gelsolin and Scinderin, and promotes re-assembly of actin cytoskeleton in human intestinal epithelial cells. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
 - 14) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
 - 15) Fujii T, Naganuma M, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: Intravenous tacrolimus therapy can rapidly induce remission in refractory ulcerative colitis. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
 - 16) Murano T, Okamoto R, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-Mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-Dependent transcription in human intestinal epithelial cells. AGA. San Diego, 2012年5月19日
 - 17) 渡辺 守: IBD 診療の進歩と近未来像-治る時代へ- 第11回市民公開講座プログラム 炎症性腸疾患の治療をめぐる 名古屋, 2012年12月16日
 - 18) 油井史郎, 中村哲也, 渡辺 守: マウスおよびヒトの正常な腸管上皮初代培養法の確立 第3回 Japan Gut Forum 東京, 2012年11月24日
 - 19) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生 第14回北関東・甲信越「GUT フォーラム」プログラム 東京, 2012年11月24日
 - 20) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生 第50回小腸研究会 京都, 2012年11月10日
 - 21) 渡辺 守: ~はじめに~治療における医師と患者のギャップ調査 JDDW2012 神戸, 2012年10月13日
 - 22) 渡辺 守: 「消化器疾患治療の最新のトピックス」大腸:炎症性腸疾患-最近の進歩- JDDW2012 神戸, 2012年10月13日
 - 23) 藤井俊光, 長堀正和, 渡辺 守: クロウン病小腸大腸病変の評価および再燃予測における MR エンテロコロノグラフィー (MREC) の有用性 JDDW2012 神戸, 2012年10月12日
 - 24) 渡辺 守: 消化器病学会特別企画 1: 日本消化器病学会ガイドライン (大腸ポリープ、機能性消化管障害、NAFLD/NASH) 中間報告 JDDW2012 神戸, 2012年10月12日
 - 25) 加納嘉人, 土屋輝一郎, 渡辺 守: 新たな「分化度」スケーリングを用いた大腸癌形質制御と個別化医療への可能性 JDDW2012 神戸, 2012年10月11日
 - 26) 渡辺 守: Go beyond usual standard care in Crohn's disease management JDDW2012 神戸, 2012年10月11日
 - 27) 渡辺 守: IBD 治療において免疫調節薬を実際にどう使うか JDDW2012 神戸, 2012年10月11日
 - 28) 渡辺 守: 新しい消化管再生医療-難病克服に向けて- 医科学術研究会 千葉, 2012年10月4日
 - 29) 土屋輝一郎, 加納嘉人, 中村哲也, 渡辺 守: 大腸における幹細胞維持とがん幹細胞発現機構 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 高知, 2012年9月28日
 - 30) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生 平成24年度第1回クリニカルサミット 東京, 2012年9月28日
 - 31) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す OMC Gastroenterology & Hepatology Research Group カンファレンス 大阪, 2012年9月27日
 - 32) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞 一培養系の確立と移植への応用- がん若手研究者ワークショップ 蓼科, 2012年9月6日
 - 33) 藤井俊光, 齊藤詠子, 長堀正和, 長沼 誠, 大塚和朗, 渡辺 守: MR enterocolonography (MREC) の実際とクロウン病小腸大腸病変の評価における有用性 第30回日本大腸検査学会総会 東京, 2012年9月1日
 - 34) 長堀正和, 藤井俊光, 齊藤詠子, 渡辺 守, 大塚和朗: クロウン病診療における当院での MREC (MR

enterocolonography)の試み モニタリングとしての
の有用性 第 30 回日本大腸検査学会総会 東京、
2012年9月1日

なし

- 35) 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守：新たな分化度スケールリングを用いた大腸がん形質制御とバイオマーカーとしての可能性 第 10 回 日本臨床腫瘍学会学術集会 大阪、2012年7月27日
- 36) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守：炎症性腸疾患難治性の要因としての腸炎惹起性メモリーCD4+T 細胞維持機構の解析 第 49 回 日本消化器免疫学会総会 鹿児島、2012年7月6日
- 37) 永石宇司、山地 統、戸塚輝治、鬼澤道夫、柘植直人、鈴木雅博、金井隆典、渡辺 守：慢性大腸炎モデルにおける腸炎惹起性 T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される 第 49 回 日本消化器免疫学会総会 鹿児島、2012年7月6日
- 38) 渡辺 守：新しい時代に入った IBD～考えておくべきこと～ 名古屋IBDセミナー 名古屋、2012年6月29日
- 39) 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長沼 誠、渡辺 守：炎症性腸疾患患者における抗 TNF α 受容体拮抗薬の選択に関する研究 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月21日
- 40) 藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長堀正和、長沼 誠、渡辺 守：難治性潰瘍性大腸炎に対する Tacrolimus 静注療法の有用性と安全性の検討 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月21日
- 41) 水谷知裕、中村哲也、渡辺 守：正常小腸上皮培養細胞を用いた MDR1 依存性薬剤排出機構の解析 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月20日
- 42) 渡辺 守：日本消化器病学会大腸ポリープ診療ガイドラインを目指して 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月20日
- 43) 本谷 聡、渡辺 守、日比紀文：日本人クローン病患者に対するアダリムマブ長期継続投与による3年間の寛解維持効果 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月19日
- 44) 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守：抗体製剤使用炎症性腸疾患患者における血中濃度測定と中和抗体測定の意義 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月19日
- 45) 中村哲也、渡辺 守：単一幹細胞からの大腸上皮大量培養と細胞移植による大腸上皮再生 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京、2012年4月19日

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

1) 特許出願

渡辺 守、中村哲也：「大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術」国際公開番号：WO2013/061608

2) 実用新案登録

なし

3) その他

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明
-炎症性腸疾患のゲノム疫学的研究-

研究分担者 松本 主之 九州大学大学院病態機能内科学准教授

研究要旨

潰瘍性大腸炎は、再燃緩解を繰り返す難治性の炎症性疾患である。これまでに全ゲノム関連研究により多数の遺伝子座が本症の発症に関与することが示されているが、その機能や治療経過等との関連については依然として不明である。本研究では、遺伝要因と環境要因の相互作用、及び、臨床経過や治療経過との関連を解析することにより、治療効果や予後予測因子の検討を行うことを目的としている。倫理審査委員会での承認を受け、検体の採取を開始した。

A. 研究目的

われわれは、本邦での潰瘍性大腸炎の全ゲノム関連研究において、*FCGR2A*、*SLC26A3*、13q12の3つの新規の遺伝子領域を本症の関連遺伝子座として同定した(Asano K et al. Nature Genetics 2009)。本研究はこれらの遺伝子多型の機能解析を進め、疾患の病態を解明するとともに、遺伝要因と環境要因の相互作用、及び、臨床経過や治療経過との関連を解析することにより、治療効果や予後予測因子の検討を行うことを目的とした。

具体的には①疾患関連遺伝子多型の解析、②疾患関連遺伝子の発現解析、③遺伝子多型別の各種薬剤の治療効果や予後の予測因子の検索の3つである。

B. 研究方法

対象者は九州大学病院病態機能内科の潰瘍性大腸炎患者と炎症性腸疾患と診断されていない者とする。解析は次の3段階から構成されている。①潰瘍性大腸炎関連遺伝子について、遺伝子多型を解析する。②免疫組織学的染色とmRNAの発現解析を行う。これらを用い遺伝子多型とmRNA、あるいは、蛋白質の組織での発現パターンの関連を調べる。これらの結果を基に、遺伝子多型が腸管炎症に及ぼす影響を調べる。③遺伝子多型や遺伝子の腸粘膜における発現量の差が、臨床病型、罹患範囲や、ステロイド、免疫調整剤、血球除去療法

などの治療効果にどのような影響があるかを解析し、疾患の病態を解明するとともに、治療効果の予測を行う。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、全ての試料については文書によるインフォームド・コンセントを行ったうえで対象者の同意を得たうえで採取および解析を行う。遺伝情報の漏洩による不利益を防ぐため、試料は匿名化した後に解析を行うこととする。

C. 研究結果

九州大学病院のヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会へ本研究計画の申請を行い、承認を受けた。下部消化管内視鏡検査を行う際に、瘍性大腸炎患者および炎症性腸疾患と診断されていない者を対象に文書によるインフォームド・コンセントを行い、血液、大腸組織(直腸、盲腸、炎症部、非炎症部)の検体採取を行っている段階である。

D. 考察

近年、全ゲノム関連研究により潰瘍性大腸炎のゲノム研究は大きく進展した。しかし、遺伝情報と臨床経過の関連を明らかにした研究はほとんどない。また、一部の遺伝子については機能が判明しているが、遺伝子多型が疾患の発症に関与する機序や臨床との関連は依然として不

明である。本研究はこれまでに発見された疾患関連遺伝子多型について、さらに解析を進めて本症の診断・治療に応用するというtranslational researchである。

遺伝子多型ごとに、各組織での発現量に差があり、遺伝子の発現量の差が潰瘍性大腸炎発症の危険因子であることや、あるいは、遺伝子多型ごとに臨床経過や、治療効果に違いがあることが分かれば、今後の治療方針決定する際に、遺伝子多型を評価することが、判断の有用な指標となる可能性がある。遺伝子多型により治療効果や予後予測が可能となれば、個別化医療の実現が可能となり、効果の少ない治療を回避することにより、患者のQOLの改善、および、医療費の削減にもつながると考えられる。

E. 結論

潰瘍性大腸炎における遺伝要因と環境要因の相互作用、臨床経過や治療経過との関連を解析するための準備が整い、試料の収集を開始した。

G. 研究発表

論文発表

1. Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M: Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:2407-2415, 2011
2. Hirano A, Yamazaki K, Umeno J, Ashikawa K, Aoki M, Matsumoto T, Nakamura S, Ninomiya T, Matsui T, Hirai F, Kawaguchi T, Takazoe M, Tanaka H, Motoya S, Kiyohara Y, Kitazono T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M: Association study of 71 European Crohn's disease susceptibility loci in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis* 19:526-533, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

炎症性腸疾患におけるエピゲノム変化の炎症と発癌における意義

研究分担者 土肥多恵子

国立国際医療研究センター研究所 肝炎免疫研究センター消化器疾患研究部長

研究要旨：潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃緩解を繰り返し発癌のリスクも高い難治疾患であることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾を明らかにすることを目的としている。その方法として治療抵抗性を示す症例の大腸生検検体のエピゲノム修飾の網羅的解析を計画した。本年度は倫理委員会の承認を受け、標本の収集を引き続き行うとともに、難治性のため手術適応となった症例から得られた標本で解析を実施した。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎やクローン病は、近年著しい増加傾向にある若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。難治性の粘膜傷害が特徴で下痢、発熱、腹痛を症状として緩解再燃を繰り返すため、患者の社会生活に大きな支障を来すばかりでなく、緩解時にも食生活に制限が必要など QOL が著しく障害される。病因として、腸内細菌に対する過剰な免疫応答が指摘されてはいるが、根治療法がなく、近年開発された抗体医薬にも応答しない患者が約 3 割にも及ぶため、更なる対策が必要である。慢性化により発癌のリスクも高くなることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。治療抵抗性に関わる因子としては、ゲノム多型に加えて、炎症によって誘導されるエピゲノム修飾による遺伝子の異常な活性化および不活化や DNA メチル化による遺伝子サイレンシングの固定化も、重要であると予測される。さらに、我々はヒトゲノム上ゲノム以外の配列であるトランスポゾンにも注目した。Long interspersed nuclear element, (L-1)はヒトゲノムの 17%を占め、レトロトランスポゾンとして DNA に挿入されているが、挿入部位によっては遺伝子機能を障害して疾患発症の誘因となり、ゲノム不安定性の原因としても重要である。通常 LI エlement は DNA メチル化によりサイレンシングされているが、我々は、潰瘍性大腸炎手術摘出標本組織においても L-1 の低メチル化がみられることを既に見いだしている。この事実は、L-1 は炎症によって活性化が誘導される可能性を示している。その結果が炎症性腸疾患の病態にどのように関わっているかは未だ明らかにされていないが、炎症発癌に関連している可能性が強いと考えている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾について、レトロトランスポゾン活性化状態を含めて明らかにすることを

目的としている。

B. 研究方法

1. 研究開始時、抗 TNF- α 抗体治療の対象症例をエントリーし、治療応答性によってグループ分けした生検試料を解析する計画とした。
2. 生検試料から上皮細胞と粘膜固有層細胞を分取し、セルソーターを用いてマクロファージ分画を精製した後、次の解析を行う予定とした。
 - (1) RNA を用いたマイクロアレイ解析または SAGE 解析による網羅的遺伝子発現解析。
 - (2) メチル化 CpG 結合蛋白 MBD を用いた MeDIP シークエンス。L-1 のメチル化解析を含む。
 - (3) 抗ヒストン 3K4 抗体を用いた ChIP シークエンス (遺伝子発現促進的修飾)
 - (4) 抗ヒストン 3K9、抗ヒストン 3K27 抗体を用いた ChIP シークエンス (発現低下修飾)

(倫理面への配慮)

本計画は、平成 22 年 12 月 16 日国立国際医療研究センター倫理委員会の承認を受けた(承認番号 937)。

C. 研究結果

治療前症例のエントリーを継続したが、抗 TNF- α 抗体未治療の対象症例の登録は無かった。そのため、抗 TNF- α 抗体治療以外の治療も対象に含め、治療効果の判定を目的とした内視鏡検査時に治療無効であった症例と奏効例に分けて試料の蓄積を試みたが、解析可能な試料の提供を得られなかった。そこで、難治例の潰瘍性大腸炎の手術摘出標本病変組織から粘膜固有層単核細胞を分離し、DNA メチル化修飾、ヒストン 3K4 トリメチル化修飾、ヒストン 3K9 トリメチル化修飾、ヒストン 3K27 トリメチル化修飾の網羅的解析を行った。昨年度に確立した、各群わずか 1×10^5 個の細胞を用いた小スケールライブラリー作製

法を用いて、次世代シーケンサーSOLiD4 解析のためのライブラリーを作製した。ChIP 後にはGAPDH (遺伝子発現促進的修飾) およびSAT2 (遺伝子発現抑制的修飾) のPCRにより目的領域が濃縮されていることを確認し、数十〜数百 nM の次世代シーケンサーを用いた解析に十分なサイズのライブラリーを得た。得られたライブラリーをSOLiD4でシーケンスし、ミスマッチ2許容、マルチプルアライメントなしの条件でゲノムマッピングした。新規にマッピングされるタグがほぼ出現しなくなることを目安にシーケンス深度を決定した結果、DNA メチル化修飾解析ではヒストン修飾解析と比べて3倍以上のタグ数が必要であった。相関解析を行った結果、ゲノムワイドな変化としては細胞種間の違いよりもエピゲノム修飾種の違いの方が大きく、また遺伝子発現抑制的ヒストン修飾(ヒストン3K9トリメチル化修飾とヒストン3K27トリメチル化修飾)間の類似性は、DNA メチル化修飾や遺伝子発現促進的ヒストン修飾(ヒストン3K4トリメチル化修飾)とよりも高かった。しかしながら個々の遺伝子に着目すると、CD3e 遺伝子座におけるヒストン3K4トリメチル化修飾(遺伝子発現促進的修飾)はCD3⁺細胞では認められるもののCD33⁺細胞には無く、逆にCD33⁺細胞ではみられるCD33 遺伝子座におけるヒストン3K4トリメチル化修飾は、CD3⁺細胞では認められず、細胞特異的エピゲノム修飾の存在が見られた。そこで、バイオインフォマティクス解析を行った結果、潰瘍性大腸炎症例のCD33⁺細胞においては炎症・インフラマソーム関連遺伝子に遺伝子発現促進的ヒストン修飾(ヒストン3K4トリメチル化修飾)が認められた。同様な解析の結果、本年度に解析した潰瘍性大腸炎3症例中1例において、CD33⁺細胞におけるゲノムワイドな低メチル化が認められた。この症例におけるゲノムワイドな低メチル化は、レトロトランスポゾンL-1とは異なる特定のリピート配列における低メチル化に起因していた。一方で、遺伝子特異的DNAメチル化の亢進ならびに低下も認められ、オントロロジー解析の結果、Positive regulation of inflammatory response 等が有意に関連する領域であった。

D. 考察

本年度は潰瘍性大腸炎病変部より分離した細胞のエピゲノム解析を行った。バイオインフォ解析の結果、細胞種特異的に疾患で変化するエピゲノム変化を見出した。本研究で見出したエピゲノム変化が、治療応答性や疾患の重症化に関連するかな否かは今後多数検体を用いて評価する必要があるが、そのためにも小数の細胞を用いたエピゲノム解析法を確立したことは大きな成果である。ゲノムワイドなDNAメチル化状態と病態との関連についても、今後更なる症例の蓄積が必要である

が、炎症性腸疾患で見られたエピゲノム変異が治療法選択の一助になるのではないかと期待している。

E. 結論

潰瘍性大腸炎病変粘膜を用いたエピゲノム解析を行い、疾患特異的なエピゲノム変化を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, Dohi T. TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice. *Mucosal Immunol*, 2013
2. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun*;4:1654, 2013
3. Inagaki-Ohara K, Mayuzumi H, Kato S, Minokoshi Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Matsuzaki G, Yoshimura A. Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice. *Oncogene*;In press, 2013
4. Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, Sato N, Kurihara M, Dohi T, Kawamura YI, Ichikawa T, Ishihara K. The monoclonal antibody HCM31 specifically recognises the Sda tetrasaccharide in goblet cell mucin. *FEBS Open Bio*;2:223-233, 2012
5. Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R. Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol*;188:4690-700, 2012
6. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Mizutani N, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T. Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy. *J Immunoassay Immunochem*;33:291-301, 2012
7. Dohi T, Burkly LC. The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases; focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol*;92:265-279, 2012

2. 学会発表

国外

1. T Dohi, R Kawashima, YI Kawamura, T Oshio, M Yamazaki, T Hagiwara, T Okada, P Wu, S Szak, YJ Kawamura, F Konishi, O Miyake, H Yano, Y Saito, L. C. Burkly, IL-13 induces TWEAK-dependent activation of TNF-alpha and intestinal epithelial cell damage -a pathway associated with ulcerative

colitis. Digestive Disease Week, 2012, San Diego, U. S. A, May 19, 2012

2. Otsubo, T., Kawamura, Y. I., Oshima, K., Endo, T. A., Toyoda, T., Hagiwara, T., Kawamura, Y. J., Konishi, F., Yano, H., Saito, Y., Hattori, M., Dohi, T. Genome-wide Epigenomic Analysis of Lamina Propria Mononuclear Cells of Inflammatory Bowel Disease. Digestive Disease Week Annual Meeting (San Diego, USA) 2012 (poster) May 22, *Selected as poster of distinction (top 10 %)*
3. Sakurai, T., Kawamura, Y. I., Hagiwara, T., Otsubo, T., Hirano Maeyasiki, C., Kojima, Y., Gotoda, T., Yano, H., Saito, Y., Kawamura, Y. J., Konishi, F., Dohi, T. DNA Hypermethylation of the Sda Carbohydrate Synthase Gene as a Possible Biomarker for the Prognosis of Ulcerative Colitis. Digestive Disease Week Annual Meeting (San Diego, USA) 2012 (oral presentation) May 19.

国内

1. Yuki I. Kawamura, Takeshi Otsubo, Kenshiro Oshima, Takaho A. Endo, Tetsuro Toyoda, Teruki Hagiwara, Yutaka J. Kawamura, Fumio Konishi, Hideaki Yano, Yukio Saito, Masahira Hattori, Taeko Dohi. Genome-wide epigenomic analysis of

lamina propria mononuclear cells isolated from patients with inflammatory bowel disease. The 6th Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology. Nov. 15, 2012, Tokyo.

2. 大坪武史、遠藤高穂、豊田哲郎、大島健志郎、萩原輝記、稲垣匡子、河村裕、小西文雄、矢野秀朗、齊藤幸夫、服部正平、河村由紀、土肥多恵子. 潰瘍性大腸炎粘膜固有層における少数のT細胞およびマクロファージ/樹状細胞を用いたエピゲノム解析. 第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡
3. 前屋敷-平野 千明、河村 由紀、萩原 輝記、大坪 武史、櫻井 俊之、小島 康志、永田 尚義、秋山 純一、神奈木 玲児、土肥 多恵子. 末梢血白血球レクチン発現は炎症性腸疾患の病勢を反映するマーカーである。第9回日本消化器病学会総会 2013年3月22日 鹿児島

1.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明
-炎症性腸疾患のゲノム解析に関する研究-

研究分担者 山本 健 九州大学生体防御医学研究所准教授

研究要旨

コモン SNP を用いた炎症性腸疾患の全ゲノム解析が日本人も含めほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子多型および遺伝子が炎症性腸疾患のどのような病態に特異的に関連するかが問われている。本研究では、炎症性腸疾患の治療抵抗性を規定する遺伝子の同定を目指している。これを効率的に進めるためには、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象とした IBD 感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析が不可欠である。検体収集機関と連携し、平成 23 年から24年度に収集されたクローン病 208 検体、潰瘍性大腸炎 32 検体について、これまでに全ゲノム関連解析で同定された HLA を含む 42 遺伝子多型の遺伝子型を取得し、クローン病 201 検体における関連検定を実施した。その結果、IL12B、TNFSF15 および STAT3 などの遺伝子領域に位置する SNP において、補正後も関連を示す SNP を認め、また、これらの SNP のリスクアレル保有数と治療抵抗性との関連を明らかにした。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)の病因、病態および抗TNF α 抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム解析により解明し、さらに、これらと臨床情報を統合的に解析することにより、難治性炎症性腸疾患の病因・病態・抗TNF α 抗体治療抵抗性機序を解明し、本疾病克服への道を拓く。

炎症性腸疾患 (IBD) は、緩解再燃を繰り返し重症化すること、高発癌性であること、さらに治療抵抗性を示す頻度が高いことが問題である。その解決のためには、(1)発症および進展に寄与する遺伝子群の解明、(2)TNF α 抗体治療抵抗性に関する遺伝子群の解明、(3)大腸発癌のリスクに関する遺伝子変異の解明、および(4)これらのエピゲノム変化の解明を行うことが必須であり、それに基づいた、患者負担の軽減を図る治療法の開発は喫緊の課題である。

本分担研究では、上記の(1)、(2)を担当し、ゲノム解析に重点的に取り組む。

B. 研究方法

臨床検体の収集: 検体収集機関である慶應義塾大学消化器内科、東京医科歯科大学消化器内科および九州大学消化器内科と連携し、倫理審査承認のもと、末梢血検体の収集と患

者情報を収集する。本研究分担者は、匿名化検体より定法にしたがって末梢血DNAを抽出し、ゲノム解析を実施する。平成23年度と24年度にCD208検体、UC32検体が収集され、このうちCD201検体がタイピングと統計解析の対象となった。

ゲノム解析: これまでに全ゲノム関連解析によって報告された遺伝子多型を文献より抽出し、これらを本研究の解析対象遺伝子とする。一塩基多型遺伝子型の決定はTaqMan法を用いる。遺伝子型や対立遺伝子頻度の差異を治療抵抗性の有無において検討する。ゲノム統計遺伝学解析にはPLINK、SAS、Rなどのプログラムを用いる。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年3月29日(平成20年12月1日一部改正))に則り、各検体採取機関、およびゲノム解析機関においては倫理委員会の承認のもと研究を遂行する。ゲノム解析について九州大学では既に承認を得ている(九州大学許可番号416-00)。

C. 研究結果

候補遺伝子多型の選択を行い、これまでに全ゲノム関連解析にて報告されたIBD感受性遺伝

子より42遺伝子を抽出した(HLA-B, HLA-DRB1, ATG16L1, ATG5, C11orf30, CARD9, CCL2, CCR6, CDKAL1, CEP72, CUL2, DLD, FCGR2A, GCKR, ICOSLG, IFNG, IKZF1, IL10, IL12B, IL18RAP, IL23R, IRGM, ITLN1, JAK2, KIF21B, LRRK2, LYRM4, MST1, NKX2-3, ORMDL3, PSMG1, PTGER4, PTPN2, PTPN22, PUS10, REL, RNF186, SLC22A23, SLC26A3, STAT3, TNFSF15, ZNF365)。これらの遺伝子の中には、日本人を対象とした全ゲノム関連解析によって同定された遺伝子も含まれており、本研究における治療抵抗性に関わる遺伝子および治療感受性の個体差を解明する上での重要な標的遺伝子群である。

これらについて201検体の遺伝子型を取得し、まず一般集団384名を対照とした関連解析を実施した。その結果、IL12B、TNFSF15およびSTAT3などの遺伝子領域に位置するSNPにおいて、補正後も相関を示すSNPを認めた(IL12B; $P=5.0 \times 10^{-4}$, OR=1.57, STAT3; $P=9.3 \times 10^{-6}$, OR=1.78, TNFSF15; $P=2.9 \times 10^{-10}$, OR=2.50、何れもアレルテスト)。

さらに、現時点で一次無効の有無が明らかな97 CD症例を対象として、SNP遺伝子型を解析した。一次無効を、初回投与が単回投与の場合その4週後、0, 2, 6週でのローディング投与の場合、最終投与から4週後の時点でCDAIが150以上の場合、または投与前より70以上低下していない場合、と定義した。一次無効症例は11症例(11%)であった。CD感受性3遺伝子座(IL12B、TNFSF15、STAT3)の代表3SNPを選択し、そのリスクアレル保有数(最小値0、最大値6)をリスクスコアとし、その分布を検討した。一次無効あり群では、リスクスコア=5が最頻値であり、一次無効無し群に比べて、分布はリスクスコアが高いほうに偏っていた。リスクスコア5を基準にし、以下の結果が得られた。

(a)一次無効あり症例の約73%はリスクスコア5または6であるが、一次無効なし症例では約30%である(OR=6.2、 $P=0.0054$)。なお、健常人でも約15%はリスクスコア5以上である。
(b)CD全体では約11%が一無効症例であったが、リスクスコア5以上を保有するCD患者では約24%に上昇する。リスクスコア5未満CD症例では約5%である。

D. 考察

コモンSNPを用いたIBDの全ゲノム解析が日本人もふくめほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子がIBDのどのような病態に特異的に関連するのかが問われている。本研究で

は、IBDの治療抵抗性を規定する遺伝子の同定を目指している。これを効率的に進めるためには、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象としたIBD感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析が不可欠である。検体収集機関と連携し、平成23、24年度に収集されたCD201検体について42遺伝子多型の情報を収集し、中間的な疾病との関連解析を実施したところTNFSF15やSTAT3、IL12Bとの明らかな相関を認め、治療抵抗性との関連を探る上での重要な対象遺伝子となることが示唆された。さらにこれの遺伝子の代表SNPのリスクアレル保有数を指標にすることにより、CD97検体の解析において、一次無効症例では有意にリスクアレルスコアが高いことを見出した。本研究班で得られたすべての症例について同様の解析を実施し、精度の高い結果を得ることが出来れば、抗TNF α 抗体治療開始前にある程度効果を予見することが可能となり、臨床医学的インパクトは大きい。

E. 結論

平成23、24年度に収集されたCD201検体を対象として、これまでに全ゲノム関連解析で同定された42遺伝子の遺伝子多型情報を取得し、IL12B、STAT3、TNFSF15遺伝子にCD感受性を確認した。さらに、抗TNF α 抗体治療効果が現時点で評価されている97検体を用いた解析によって、一次無効例では、上記3SNPのリスクアレル保有数が有意に高いことを明らかにした。

G. 研究発表

論文発表

Kitajima H, Sonoda M, Yamamoto K. HLA and SNP haplotype mapping in the Japanese population. *Genes Immun.* 2012 Oct;13(7):543-548.

Yoshimura S, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Yamamoto K, Kira J, the South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2012;7(11):e48592.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析に
よる病因・病態・治療抵抗性機序の解明に関する研究

研究分担者 石谷 太 九州大学生体防御医学研究所・准教授

研究要旨

潰瘍性大腸炎およびクローン病は、難治性かつ高発癌性の腸疾患であり、その病因、病態の解明は喫緊の課題である。本分担研究では、その解決のために、腸上皮の再生分化を制御するシグナル制御因子に特に注目し、その機能及び腸疾患発症との関連性を解析している。平成24年度は、Notchシグナル制御因子の働きが腸上皮の構築に必須であることを発見し、また、また、大腸癌においてWntシグナルと癌遺伝子の発現を抑制する因子を見いだした。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎およびクローン病は、難治性かつ高発癌性の腸疾患であり、その病因、病態の解明は喫緊の課題である。その解決のためには、発症及び進展に寄与する遺伝子群の解明や、大腸発癌のリスクに関与する遺伝子変異の解明が必要である。本分担研究では、腸上皮の再生分化を制御するWntシグナル及びNotchシグナルの制御因子に特に注目し、その機能及び、腸疾患発症との関連性を解析する。

B. 研究方法

ヒト腸上皮由来細胞株とモデル脊椎動物ゼブラフィッシュを用い、腸上皮の再生分化を制御する分子群の分子・細胞・組織レベルの機能を解明する。また、ヒトゲノム解析により、腸上皮の再生分化を制御する分子群の腸疾患発症との関連性を解析する。
(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、及び遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

Notchシグナルは杯細胞の形成を抑制するなど、腸上皮の再生分化において必須の役割を果たす。これまでに我々は、タンパク質リン酸化酵素NLKが腸上皮細胞株においてNotchシグナルを抑制することを見いだしていた。今回、腸上皮組織におけるNLKの機能を解析するためにゼブラフィッシュにおいてNLKの機能阻害実験を行ったところ、NLK阻害個体の腸上皮においてNotchシグナル活性の亢進と、杯細胞マーカー遺伝子の発現低下、杯細胞などの粘液細胞の減少が観察された。

また、昨年度に大腸癌において発現が低下する遺伝子として新たに見いだされたHIPK2の機

能解析を行い、大腸癌細胞株LovoにおいてHIPK2をRNAiにより機能阻害するとWntシグナル標的遺伝子であるAxin2と癌遺伝子c-Mycの発現が亢進することを見いだした。

D. 考察

潰瘍性大腸炎の腸上皮では杯細胞の減少が観察されるが、本研究によりNLKの機能破綻も杯細胞の減少を引き起こすことが示された。このことは、NLKによるNotchシグナル制御の破綻が潰瘍性大腸炎の発症に関与する可能性を示唆している。

Wntシグナルの制御の破綻は腸疾患を引き起こす。本研究の成果は、HIPK2によるWntシグナル抑制の破綻が、腸疾患の発症に関与する可能性を示唆している。

E. 結論

今後、腸上皮の再生分化におけるNLKやHIPK2の細胞・組織レベルの機能をさらに詳細に明らかにすることが重要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishitani T, Ishitani S.

Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator.

Cellular Signalling 25: 190-197 (2013)

2. 学会発表

Ishitani T, Ishitani S

A dual and opposite role of NLK-mediated Lef1 phosphorylation on the Wnt/beta-catenin signaling
第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会 合同年会(口頭発表)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, Sato T, Koganei K, Sugita A, Kanai T, and <u>Hibi T.</u>	TGR5 signaling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease.	Immunology	139 (1)	19-29	2013
Hosoe N, Matsuoka K, Naganuma M, Ida Y, Ishibashi Y, Kimura K, Yoneno K, Usui S, Kashiwagi K, Hisamatsu T, Inoue N, Kanai T, Imaeda H, Ogata H, <u>Hibi T.</u>	Applicability of second generation colon capsule endoscope to ulcerative colitis: A clinical feasibility study.	J Gastroenterol Hepatol	10(11)	12203	2012
Nakamura Y, Kanai T, Saeki K, Takabe M, Irie J, Miyoshi J, Mikami Y, Teratani T, Suzuki T, Miyata N, Hisamatsu T, Nakamoto N, Yamagishi Y, Higuchi H, Ebinuma H, Hozawa S, Saito H, Itoh H, <u>Hibi T.</u>	CCR2 knockout exacerbates cerulein- induced chronic pancreatitis with hyperglycemia via decreased GLP-1 receptor expression and insulin secretion.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	304(8)	G700-7	2012
Handa T, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Mizuno S, Matsumoto A, Hisamatsu T, <u>Hibi T.</u>	Dendritic cells administered intrarectally penetrate the intestinal barrier to break intestinal tolerance via Th2-mediated colitis in	Immunol Lett	150(1-2)	123-129	2012
Nishida A, Nagahama K, Imaeda H, Ogawa A, Lau CW, Kobayashi T, Hisamatsu T, Preffer FI, Mizoguchi E, Ikeuchi H, <u>Hibi T.</u> , Fukuda M, Andoh A, Blumberg RS, Mizoguchi A.	Inducible colitis-associated glycome capable of stimulating the proliferation of memory CD4+ T cells.	J Exp Med	209(13)	2383-2394	2012
Mikami Y, Kanai T, Iwasaki E, Naganuma M, Yamagishi Y, Shimoda M, Matsuoka K, Hisamatsu T, Iwao Y, Ogata H, Nakatsuka S, Mukai M, <u>Hibi T.</u>	Anticoagulation therapy dramatically improved severe sigmoiditis with findings resembling inflammatory bowel disease, which was caused by mesenteric venous thrombosis.	Clinical Journal of Gastroenterology	5	377-382	2012
Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, <u>Hibi T.</u>	Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease.	Pharmacol Ther	137(3)	283	2012

Chang J, Hisamatsu T, Shimamura K, Yoneno K, Adachi M, Naruse H, Igarashi T, Higuchi H, Matsuoka K, Kitazume MT, Ando S, Kamada N, Kanai T, and <u>Hibi T.</u>	Activated Hepatic Stellate Cells Mediate the Differentiation of Macrophages.	Hepatology Research		in press	2012
Kimura K, Kanai T, Hayashi A, Mikami Y, Sujino T, Mizuno S, Handa T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Sato T, <u>Hibi T.</u>	Dysregulated balance of retinoid-related orphan receptor γ -dependent innate lymphoid cells is involved in the pathogenesis of chronic DSS-induced colitis.	Biochem Biophys Res Commun	427(4)	694-700	2012
Uo M, Hisamatsu T, Miyoshi J, Kaito D, Yoneno K, Kitazume MT, Mori M, Sugita A, Koganei K, Matsuoka K, Kanai T, <u>Hibi T.</u>	Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through Fc γ R-mediated CD14+ macrophage activation.	Gut		Epub ahead of print	2012
Hisamatsu T, <u>Hibi T.</u>	-Is the dendritic cell a missing piece in the pathogenesis model of post-infectious irritable bowel syndrome? - Editorial for "Characteristics of intestinal lamina propria dendritic cells in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome."	J Gastroenterol Hepatol	27(5)	847-848	2012
Maruyama Y, Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Kanai T, <u>Hibi T.</u>	A Case of Intestinal Behçet's Disease Treated with Infliximab Monotherapy Who Successfully Maintained Clinical Remission and Complete Mucosal Healing for Six Years.	Intern Med	51(16)	2125-2129	2012
Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, <u>Hibi T.</u>	T-helper 17 and Interleukin-17-Producing Lymphoid Tissue Inducer-Like T Cells Make Different Contributions to Colitis in Mice.	Gastroenterology	143(5)	1288-1297	2012
Takayama T, Kanai T, Matsuoka K, Okamoto S, Sujino T, Mikami Y, Hisamatsu T, Yajima T, Iwao Y, Ogata H, <u>Hibi T.</u>	Long-term prognosis of patients with ulcerative colitis treated with cytapheresis therapy.	J Crohns Colitis.	7(2)	e49-54	2012
Mizuno S, Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Handa T, Matsumoto A, Nakamoto N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, <u>Hibi T.</u>	CCR9(+) plasmacytoid dendritic cells in the small intestine suppress development of intestinal inflammation in mice.	Immunol Lett	146(1-2)	64-69	2012

Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T.	Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway.	Immunology	136(2)	153-162	2012
Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M, Hibi T.	Novel, Objective, Multivariate Biomarkers Composed of Plasma Amino Acid Profiles for the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease.	PLoS ONE	7(1)	e31131	2012
Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam MS, Camez A; Study Investigators. (Motoya S, Kinouchi Y, Suzuki Y, Katsuno T, Ohtsuka K, Okamura S, Hirata I, Ando T, Nakase H, Oshitani N, Watanabe K, Ito H, Matsumoto T, Tanaka S, Inoue H, Sakai Y, Matsumoto T, Mitsuyama K, Tomiyasu N, Kumemura H, Kinjo F, Hisamatsu T, Matsui T, Shiratori K, Miyata M, Mizuno M, Fujiyama Y, Andoh A, Kato J, Ashida T, Fujiya M, Ohkusa T, Osada T, Takazoe M, Hanai H, Ichimori T, Okawa K.)	Adalimumab for the induction and maintenance of clinical remission in Japanese patients with Crohn's disease.	J Crohns Colitis	6(2)	160-73	2012
Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Hisamatsu T, Hibi T.	ROR γ t-dependent IL-17 A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation.	Mucosal Immunol	5	240-247	2012
金井隆典 松岡克善 久松理一 岩男 泰 緒方晴彦 日比紀文	総説『インフリキシマブ二次無効の機序と対策, 治療方針』	日本消化器病学会雑誌	109(3)	364-9	2012
Dohi T, Burkly LC.	The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases; focus on inflammatory bowel diseases.	J Leukoc Biol	92	265-279	2012

Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, <u>Dohi T.</u>	TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice.	Mucosal Immunol.		in press	
Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, <u>Dohi T.</u>	Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice.	Nat Commun	4	1654	2013
Inagaki-Ohara K, Mayuzumi H, Kato S, Minokoshi Y, Otsubo T, Kawamura YI, <u>Dohi T.</u> , Matsuzaki G, Yoshimura A.	Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice.	Oncogene		in press	2013
Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, Sato N, Kurihara M, <u>Dohi T.</u> , Kawamura YI, Ichikawa T, Ishihara K.	The monoclonal antibody HCM31 specifically recognises the Sda tetrasaccharide in goblet cell mucin.	FEBS Open Bio	2	223-233	2012
Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, <u>Dohi T.</u> , Kannagi R.	Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9.	J Immunol	188(9)	4690-4700	2012
Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Mizutani N, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, <u>Dohi T.</u>	Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy.	J Immunoassay Immunochem	33	291-301	2012
Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Hbrita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, <u>Watanabe M</u>	The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein.	Biochem Biophys Res Commun.	432	175-181	2013
Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, <u>Watanabe M.</u>	Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD.	Inflamm Bowel Dis.	19	418-422	2013

Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, <u>Watanabe M</u> , Hibi T, on behalf of the guideline project group of intractable Inflammatory Bowel Disease granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese	Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan.	J Gastroenterol.	48	31-72	2013
Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, <u>Watanabe M</u> .	Modified single-operator method for double-balloon endoscopy.	Digestive Endoscopy.	24	470-474	2013
Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Morio-Akiyama J, Fujii T, Okamoto R, <u>Watanabe M</u> .	Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy for the diagnosis of inverted Meckel's diverticulum.	J Med Case Reports.	6	328	2013
Fujita K, Naganuma M, Saito E, Suzuki S, Araki A, Negi M, Kawachi H, <u>Watanabe M</u> .	Histologically confirmed IgG4-related small intestinal lesions diagnosed via double balloon enteroscopy.	Dig Dis Sci.	57	3303-3308	2012
Hibi T, Sakuraba A, <u>Watanabe M</u> , Motoya S, Ito H, Mitegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T.	Retrieval of serum infliximab level by shortening the maintenance infusion interval is correlated with clinical efficacy in Crohn's disease.	Inflamm Bowel Dis.	18	1480-1487	2012
Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Ito N, <u>Watanabe M</u> , Hibi T, Takebayashi T	Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients.	J Gastroenterol.	47	961-968	2012
Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, <u>Watanabe M</u>	Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients.	J Crohn's & colitis.	7	308-313	2012
Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Takeuchi Y, <u>Watanabe M</u>	A prospective analysis of the incidence and risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease.	J Gastroenterol.		Epub ahead of print	2012

Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, <u>Watanabe M</u>	Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4+ memory T cells.	Gut.		Epub ahead of print	2012
Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi M, <u>Watanabe M</u>	Histological diagnosis of follicular lymphoma by biopsy of small intestinal normal mucosa.	Digestive Endoscopy.	39	533-539	2012
Ohyagi M, Chkubo T, Yagi Y, Ihibashi S, Akiyama J, Nagahori M, <u>Watanabe M</u> , Yokota T, Mizusawa H	Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with crohn's disease.	Intern Med.	52	125-128	2012
<u>Watanabe M</u> , Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y	Comparison of QD and TID oral mesalazine for maintainance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study.	Inflamm Bowel Dis.		in press	2012
Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hbi T, <u>Watanabe M</u>	Time trend and risk factors for reoperation in Crohn's disease in Japan.	Hepatogastroenterology.	59	1081-1086	2012
Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, <u>Watanabe M</u>	Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro.	Biochem Biophys Res Commun	419	238-243	2012
Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, <u>Watanabe M</u>	Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell.	Nat Med	18	618-623	2012
Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, <u>Watanabe M</u>	The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis.	J Immunol	188	2524-2536	2012

Watanabe M, <u>Hibi T</u> , Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam M.S, Camez AC	Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease	J Crohns Colitis	6	160-173	2012
Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukusima K, Futami K, <u>Hibi T</u> , <u>Watanabe M</u>	Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for a third operation for Crohn's disease.	Inflamm Bowel Dis	18	17-24	2012
<u>Ishitani T</u> , Ishitani S.	Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator.	Cellular Signalling	25	190-197	2013
Doi K, Fujimoto T, Okamura T, Ogawa M, Tanaka Y, Mototani Y, Goto M, Ota T, Matsuzaki H, Kuroki M, Tsunoda T, <u>Sasazuki T</u> , Shirasawa S.	ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response.	Biochem Biophys Res Commun.	425	107-112	2012
Kitajima H, Sonoda M, <u>Yamamoto K</u> .	HLA and SNP haplotype mapping in the Japanese population.	Genes Immun.	13	543-548	2012
Hirano A, Yamazaki K, Umeno J, Ashikawa K, Aoki M, <u>Matsumoto T</u> , Nakamura S, Ninomiya T, Matsui T, Hirai F, Kawaguchi T, Takazoe M, Tanaka H, Motoya S, Kiyohara Y, Kitazono T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M	Association study of 71 European Crohn's disease susceptibility loci in a Japanese population.	Inflamm Bowel Dis	19	526-533	2013

知的所有権の出願・取得状況

種類	受付（識別）番号	出願日
<u>渡辺 守</u> 、中村哲也	公開番号（W02013/061608） 公開日（2013. 5. 2）	2011年10月27日
公開	大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術	



ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response

Keiko Doi^{a,b,c,1}, Takahiro Fujimoto^{a,b,1}, Tadashi Okamura^{d,1}, Masahiro Ogawa^b, Yoko Tanaka^a, Yasumasa Mototani^d, Motohito Goto^d, Takeharu Ota^a, Hiroshi Matsuzaki^a, Masahide Kuroki^b, Toshiyuki Tsunoda^{a,b}, Takehiko Sasazuki^e, Senji Shirasawa^{a,b,*}

^a Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

^b Central Research Institute for Advanced Molecular Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

^c Central Research Institute of Life Sciences for the Next Generation of Women Scientists, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

^d Division of Animal Models, Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan

^e Institute for Advanced Study, Kyushu University, Fukuoka, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2012

Available online 22 July 2012

Keywords:

T cell homeostasis
TCR-mediated response
ZFAT

ABSTRACT

ZFAT, originally identified as a candidate susceptibility gene for autoimmune thyroid disease, has been reported to be involved in apoptosis, development and primitive hematopoiesis. *Zfat* is highly expressed in T- and B-cells in the lymphoid tissues, however, its physiological function in the immune system remains totally unknown. Here, we generated the T cell-specific *Zfat*-deficient mice and demonstrated that *Zfat*-deficiency leads to a remarkable reduction in the number of the peripheral T cells. Intriguingly, a reduced expression of IL-7R α and the impaired responsiveness to IL-7 for the survival were observed in the *Zfat*-deficient T cells. Furthermore, a severe defect in proliferation and increased apoptosis in the *Zfat*-deficient T cells following T cell receptor (TCR) stimulation was observed with a reduced IL-2R α expression as well as a reduced IL-2 production. Thus, our findings reveal that *Zfat* is a critical regulator in peripheral T cell homeostasis and its TCR-mediated response.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

We previously identified ZFAT (zinc-finger gene with AT-hook/zinc-finger gene in the autoimmune thyroid disease susceptibility region) as a candidate susceptibility gene for autoimmune thyroid disease [1]. ZFAT encodes an evolutionally conserved protein with 18 zinc-finger domains and one AT-hook domain [2], and *Zfat* is strongly expressed in T- and B-cells in the mouse immune-related tissues [2]. We previously reported that the *Zfat*-deficient (*Zfat*^{-/-}) mouse is embryonic lethal, and that *Zfat* is a critical transcriptional regulator in primitive hematopoiesis [3]. ZFAT is also involved in the regulation of apoptosis in cells of the human leukemia cell line MOLT-4 cells [4] and mouse embryonic fibroblasts [5], and in the differentiation of human umbilical vein endothelial cells [6]. Furthermore, genetic variants of ZFAT have been reported to be associated with adult height [7,8], with common diseases including hypertension and cancer [9,10], and with interferon- β responsiveness in multiple sclerosis [11], in which *IL-7RA* and *IL-2RA* are sus-

ceptibility genes [12–15]. Despite these advances, the function of ZFAT in the immune system remains totally unknown.

Proper regulation of peripheral T cell homeostasis is highly controlled by both cell-extrinsic and cell-intrinsic factors [16–19]. Growing evidence demonstrates that peripheral T cell homeostasis is controlled by cytokine receptor-mediated signals, especially interleukin-7 receptor (IL-7R) and interleukin-2 receptor (IL-2R) signals, as well as the interaction between TCR and major histocompatibility complex [20,21].

IL-2/IL-2R exhibits the ability to drive T cell proliferation, mediate activation-induced cell death, promote the development of regulatory T cells and modulate the expression of cytokine receptors [22,23]. The IL-2R has three chains: α , β and the common cytokine receptor γ . Resting T cells express a receptor form composed of β and γ chains that bind IL-2 with moderate affinity, whereas activation of T cells induces the α chain (a high-affinity subunit) and the formation of the high-affinity heterotrimeric receptor, which plays a critical role in T cells in the physiological context [24]. On the other hand, the IL-7R complex is composed of IL-7R α and the γ -chain, and IL-7 signaling is mainly regulated by IL-7R α expression in T cells [25].

Several transcriptional factors are reported to play critical roles in peripheral T cell homeostasis as cell-intrinsic factors [26–28],

* Corresponding author. Address: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan. Fax: +81 92 864 3865.

E-mail address: sshirasa@fukuoka-u.ac.jp (S. Shirasawa).

¹ These authors contributed equally to this work.